

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 03 / 148 76

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 12 FEB 2004

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 00 649.4

Anmeldetag: 09. Januar 2003

Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden
durch Kultivierung von genetisch veränderten
Organismen

IPC: C 12 N, C 12 P, A 01 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 2. Dezember 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Letang

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp bereits eine Ketolase-Aktivität aufweisen, und die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bewirkt.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Ketolase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp verursacht.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Organismen verwendet, die transgen eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, exprimieren.
- 35 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Organismen einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch

2

Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 5 8. Verfahren nach Anspruch 5 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.
- 10 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und β -Cyclase-Aktivität, aufweisen.
- 15 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine β -Cyclase in den Organismus einbringt.
- 25 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt, die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 aufweist.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 5 einbringt.
- 35 14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, Nukleinsäuren einbringt, die eine β -Cyclase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 8 aufweist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 7 einbringt.

3

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Organismen erntet und anschließend die Ketocarotinoide aus den Organismen isoliert.
- 5 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet daß man als Organismus einen Organismus verwendet, der als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung oder Umregulierung von Stoffwechselwegen in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.
- 10 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismen Mikroorganismen oder Pflanzen verwendet.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismen Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze verwendet.
- 20 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Phaffia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium*, *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*.
- 25 21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus Pflanzen verwendet.
- 30 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae verwendet.
- 35 23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hisbiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Li-*

num, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketocarotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

25. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase

A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

26. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

27. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der

Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist

- 5 28. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 10 29. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 15 30. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und β -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20 31. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 30, dadurch gekennzeichnet daß er als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementation in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.
- 25 32. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 31, ausgewählt aus der Gruppe Mikroorganismen oder Pflanzen.
- 30 33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.
- 35 34. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium*, *Haematococcus*, *Phaedactylum tricoratum*, *Volvox* oder *Dunaliella*.
- 35 35. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen ausgewählt sind aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Pri-

6

mulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae verwendet.

- 5 36. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass Pflanzen ausgewählt sind aus den Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*,
10 *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Marattia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*,
15 *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia* verwendet.
- 20 37. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 als Futter- oder Nahrungsmittel.
- 25 38. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln.
- 30 39. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 2 nicht enthalten ist.
- 35 40. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 aufweist.
41. Nukleinsäure, kodierend ein Protein gemäß 39 oder 40, mit der Maßgabe, dass die Sequenz SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3 nicht enthalten sind.

42. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

5

43. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

10

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

10

Ketocarotinoide treten hauptsächlich bei Bakterien, wenigen Pilzen und als Sekundärcarotinoide bei Grünalgen auf. Neben Echinenon, dem 4-Monoketo Derivat des β -Carotins wird auch die entsprechende symmetrische Diketo Verbindung Canthaxanthin gebildet. Daneben sind von den o.g. Organismengruppen einige wenige Spezies bekannt, in denen Astaxanthin (= 3,3'-Hydroxy-4,4'-keto- β -carotin) als Endprodukt der Biosynthese (zusammen mit geringen Mengen entsprechender Intermediate) zu finden ist (Goodwin, T.W. (1980) The Biochemistry of the Carotenoids, Vol. 1: Plants, 2nd edn. Chapman & Hall, New York.; Johnson, E.A. & An G.-H. (1991) Astaxanthin from microbial sources. Critical Rev. Biotechnol. 11, 297-326.; 3. Lorenz, R.T. & Cysewski, G.R. (2000) Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. Trend Biotechn. 18, 160-167).

15

20

Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

25

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

30

Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.

35

Spezifische Ketolase Gene des *crtW* Typs wurden aus den Bakterien *Agrobacterium aurantia-cum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), *Paracoccus marcusii* (Accession NO: Y15112) und als cDNA aus *Haematococcus* (*Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*, NIES-144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128, Accession NO: X86782 und D45881)) kloniert und funktionell identifiziert.

40

Daneben existieren noch ORFs aus anderen Organismen, die auf Grund von Aminosäure Homologien als Ketolase Gene bezeichnet werden, wie beispielsweise Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase aus *Alcaligenes sp. PC-1* (EP 735137, Accession NO: D58422), *Synechocystis sp. Strain PC6803* (Accession NO: NP_442491), *Bradyrhizobium sp.* (Accession NO: AF218415), *Nostoc sp. PCC 7120* (Kaneko et al, DNA Res. 2001, 8(5), 205 - 213; Accession NO: AP003592, BAB74888) und *Brevundimonas aurantiaca* (WO 02079395).

Biochemisch sind lediglich die Ketolase aus *A. aurantiacum* und *Alcaligenes spec.* charakterisiert worden (Fraser P.D., Shimada H. & Misawa N.(1998) Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay. Eur. J. Biochem. 252, 229-236.). Es gibt noch einen weiteren Typ von β -Carotin Ketolase Genen, *crtO* aus dem Cyanobacterium *Synechocystis*, das keine Ähnlichkeit mit *crtW* aufweist und mit den bakteriellen Desaturasen verwandt ist (Fernandez-Gonzalez, B., Sandmann, G. & Vioque, A (1997) A new type of asymmetrically acting β -carotene ketolase is required for the synthesis of echinenone in the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803*. J. Biol. Chem. 272, 9728-9733.)

Alle bekannten Ketolasen können bei β -Carotin in Position 4 eine Ketogruppe einfügen. Das *crtO* Gen kodiert für eine Monoketolase, die Echinenon als Endprodukt aus β -Carotin bildet. Die *crtW* Genfamilie, zu der auch bkt aus *Haematococcus* gehört, kodiert für eine Diketolase, die β -Carotin bis zu Canthaxanthin umsetzt. Diese Reaktion scheint der erste Modifikationsschritt in Richtung Astaxanthin zu sein, dem sich eine Hydroxylierung an Position 3 anschließt. Die gleiche Reaktionssequenz gilt dann auch für den zweiten Ionon Ring (9). Es gibt auch enzymatische Hinweise, dass 3-Hydroxy- β -carotin Derivate nur schlecht an Position 4 ketoliert werden können. Es hat sich ebenfalls gezeigt, dass nur bestimmte bakterielle Hydroxylasen, wie die von *Erwinia uredovora* (Breitenbach, J., Misawa, N., Kajiwara, S. & Sandmann, G. (1996) Expression in *Escherichia coli* and properties of the carotene ketolase from *Haematococcus pluvialis*. FEMS Microbiol. Lett. 140, 241-246) oder *A. aurantiacum* in der Lage sind ketolierte Intermediate umzusetzen. Die strukturell unterschiedlichen Hydroxylasen der Cyanobakterien können dies nicht (Albrecht, M., Steiger, S. & Sandmann, G. (2001) Expression of a ketolase gene mediates the synthesis of canthaxanthin in *Synechococcus* leading to resistance against pigment photodegradation and UV-B sensitivity of photosynthesis. Photochem. Photobiol. 73, 551-555.). Es erfolgt keine Kooperation dieses Typs von Hydroxylase mit einer Ketolase, und man erhält keine substantiellen Mengen an Astaxanthin.

EP 735 137 beschreibt die Herstellung von Xanthophyllen in Mikroorganismen, wie beispielsweise *E. coli* durch Einbringen von Ketolase-Genen (*crtW*) aus *Agrobacterium aurantiacum* oder *Alcaligenes sp. PC-1* in Mikroorganismen.

Aus EP 725 137, WO 98/18910, Kajiwara et al. (Plant Mol. Biol. 1995, 29, 343-352) und Hirschberg et al. (FEBS Letters 1995, 364, 125-128) ist es bekannt, Astaxanthin durch Einbringen von Ketolase-Genen aus *Haematococcus pluvialis* (crtW, crtO oder bkt) in *E. coli* herzustellen.

- 5 Hirschberg et al. (FEBS Letters 1997, 404, 129-134) beschreiben die Herstellung von Astaxanthin in *Synechococcus* durch Einbringen von Ketolase-Genen (crtO) aus *Haematococcus pluvialis*. Sandmann et al. (Photochemistry and Photobiology 2001, 73(5), 551-55) beschreiben ein analoges Verfahren, das jedoch zur Herstellung von Canthaxanthin führt und nur Spuren Astaxanthin liefert.
- 10 WO 98/18910 und Hirschberg et al. (Nature Biotechnology 2000, 18(8), 888-892) beschreiben die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakblüten durch Einbringen des Ketolase-Gens aus *Haematococcus pluvialis* (crtO) in Tabak.
- 15 WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, in Samen von Ölsaatpflanzen wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promotors und einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*.
- 20 Alle im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden und insbesondere die beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Astaxanthin weisen den Nachteil auf, daß die transgenen Organismen nur geringe Mengen an Astaxanthin liefern.
- 25 Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere genetisch veränderte Organismen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die die vorstehend beschriebenen Nachteile des Standes der Technik in geringerem Maße oder nicht mehr aufweisen.
- 30 Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Organismen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität
- 35 von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Die erfindungsgemäßen Organismen wie beispielsweise Mikroorganismen oder Pflanzen sind vorzugsweise als Ausgangsorganismen natürlicherweise in der Lage, Carotinoide wie beispielsweise β -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen, oder können durch genetische Veränderung, wie

beispielsweise Umregulierung von Stoffwechselwegen oder Komplementierung in die Lage versetzt werden, Carotinoide wie beispielsweise β -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen.

- 5 Einige Organismen sind als Ausgangs- oder Wildtyporganismen bereits in der Lage, Ketocarotinoid wie beispielsweise Astaxanthin oder Canthaxanthin herzustellen. Diese Organismen, wie beispielsweise *Haematococcus pluvialis*, *Paracoccus marcusii*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Bacillus circulans*, *Chlorococcum*, *Phaffia rhodozyma*, *Adonis sp.*, *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Chlorella zofingiensis*, *Ankistrodesmus braunii*, *Euglena sanguinea*, *Bacillus atrophaeus*, *Blakeslea* weisen bereits als Ausgangs- oder Wildtyporganismus eine Ketolase-Aktivität auf.
- 10

- 15 In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die bereits als Wildtyp oder Ausgangsorganismus eine Ketolaseaktivität aufweisen. In dieser Ausführungsform bewirkt die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp oder Ausgangsorganismus.

Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

- 20 Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

- 25 Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

- 30 Bei einer erhöhten Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase die umgesetzte Menge β -Carotin bzw. die gebildete Menge Canthaxanthin erhöht.

- 35 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Ketolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Ketolase-Aktivität des Wildtyps.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsorganismus verstanden.

Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Organismus" der Ausgangsorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Organismus oder beides verstanden werden.

5

Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Ketocarotinoiden jeweils ein Referenzorganismus verstanden.

10

Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Haematococcus pluvialis*.

15

Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die als Wildtyp keine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Blakeslea*.

20

Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase-Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Adonis aestivalis*, *Adonis flammeus* oder *Adonis annuus*, besonders bevorzugt *Adonis aestivalis*.

25

Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen, vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

30

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

35

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzen- oder Mikroorganismenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen oder Mikroorganismus-Extrakten wird mit den Substraten β -Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

Die Erhöhung der Ketolase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Protein-

ebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Ketolase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in den Organismus.

- 5 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, wird erfindungsgemäß in dieser Ausführungsform auch die Manipulation der Expression der Organismen eigenen endogenen Ketolasen verstanden. Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Ketolase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endo-
- 10 genen Ketolase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

- 15 Es ist wie vorstehend beschrieben möglich, die Expression mindestens einer endogenen Ketolase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdsubstanzen erfolgen.

- 20 Des weiteren kann eine erhöhte Expression mindestens eines endogenen Ketolase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im Wildtyporganismus nicht vorkommendes oder modifiziertes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

- 25 Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

- 30 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 35 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Organismen, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Ketolase-Gen vor, kodierend eine Ketolase, ent-

haltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 5 In dieser Ausführungsform weist der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus dementsprechend mindestens eine exogene (=heterologe) Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, auf, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine
- 10 Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolaseaktivität aufweisen.

- 15 In dieser bevorzugten Ausführungsform verursacht die genetische Veränderung die Ketolase-Aktivität in den Organismen. Der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus weist somit in dieser bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser
- 20 Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 25 In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, analog zu der vorstehend beschriebenen Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz
- 30 SEQ. ID. NO. 2 aufweist, in den Ausgangsorganismus.

- Dazu kann in beiden Ausführungsformen prinzipiell jede Nukleinsäuren, die eine Ketolase kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität
- 35 von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, verwendet werden.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, führt im erfindungsgemäßen Verfahren überraschenderweise zu einer höheren Ausbeute an Ketocaroti-

noiden, insbesondere an Astaxanthin als bei der Verwendung der im Stand der Technik verwendeten Ketolase-Gene.

5 Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

10 Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

15 Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, und die entsprechenden Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, die im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft verwendet werden können, sind beispielsweise Sequenzen aus

20 *Nostoc punctiforme* PCC73102 ORF 38, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000195, Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 1); Protein: Acc.-No. ZP_00111258 (SEQ ID NO: 2) (als putatives Protein annotiert) oder

Nostoc punctiforme PCC73102 ORF 148, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 3), Protein: (SEQ ID NO: 4) (nicht annotiert)

25 oder von diesen Sequenzen abgeleitete Ketolasesequenzen.

Abbildung 1 zeigt zusätzlich die Nukleinsäuresequenzen von ORF 38 und ORF 148 aus *Nostoc punctiforme*.

30 Für die Herstellung von Astaxanthin ist insbesondere die Verwendung der Ketolase *Nostoc punctiforme* PCC73102 ORF 148, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 3), Protein: (SEQ ID NO: 4) oder von dieser Sequenz abgeleitete Sequenzen besonders bevorzugt.

35 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 leicht auffinden.

5 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10 Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenter (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

15 Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

20 Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

25 Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenter Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

30 Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

35 Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrill sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

(iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

- (iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder
- 5 (v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- (vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder
- 10 (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder
- (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder
- 15 (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (moderate Bedingungen).
- (2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel
- (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder
- 20 (ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder
- (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder
- 25 (iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- (v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder
- (vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).
- 30 In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die eine Ketolase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 65 %, vorzugsweise mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 75 %, bevorzugter mindestens 80 %, bevorzugter mindestens 85 %, bevorzugter mindestens 90 %, bevorzugter mindestens 95 %, besonders bevorzugt mindestens 98 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist.
- 35

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz, die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap opening penalty	10
Gap extension penalty	10
Gap separation penalty range	8
Gap separation penalty	off
% identity for alignment delay	40
Residue specific gaps	off
Hydrophilic residue gap	off
Transition weighing	0

Pairwise alignment parameter:

FAST algorithm on

K-tuple size	1
Gap penalty	3
5 Window size	5
Number of best diagonals	5

Unter einer Ketolase, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Ketolase verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 42 % aufweist.

Beispielsweise weist nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz die Sequenz der Ketolase aus *Nostoc punctiforme* PCC73102 ORF 148 (SEQ ID NO: 4) mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc punctiforme* PCC73102 ORF 38 (SEQ ID NO: 2) eine Identität von 64% auf.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Die "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 in den Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Die Sequenz der Ketolase aus *Nostoc punctiforme* PCC73102 ORF 38 (SEQ ID NO: 2) weist mit den Sequenzen der Ketolasen die in den Verfahren des Standes der Technik verwendet werden

eine Identität von 38% (*Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), 38% (*Alcaligenes sp. PC-1* (EP 735137, Accession NO: D58422) und 19 bis 21 % (*Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*, NIES-144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128, Accession NO: X86782 und D45881) auf.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zur erhöhten Ketolase-Aktivität eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität aufweisen.

10 Unter Hydroxylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

15

Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

20 Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin oder Canthaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

25 Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge β -Carotin oder Canthaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

30 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugt mindestens 300 %, noch bevorzugt mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

Unter β -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Cyclase verstanden.

35 Unter einer β -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen β -Ionon-Ring zu überführen.

Insbesondere wird unter einer β -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, γ -Carotin in β -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter β -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. gebildete Menge β -Carotin verstanden.

- 5 Bei einer erhöhten β -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase die umgesetzte Menge an Lycopin bzw. γ -Carotin oder die gebildete Menge an γ -Carotin aus Lycopin bzw. die gebildete Menge an β -Carotin aus γ -Carotin erhöht.
- 10 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der β -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.
- 15 Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:
- 20 Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie β -Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.
- 25 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):
- 30 Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Organismusextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C
- 35 inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

Die Bestimmung der β -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Die Aktivität der β -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP⁺, NADPH und ATP zugegeben.

- 10 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der β -Cyclase -Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibitions; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

- 15 Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 250 μ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Organismusextrakt, 20 nM Lycopin, 250 μ g an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP⁺, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

- 25 Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder von Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp.

- 30 Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder β -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von
- 35 einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder β -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, in den Organismus.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase und/oder β -Cyclase, wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus eigenen endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase verstanden.

5 Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder β -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

10 Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

15 Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder β -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

20 Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

25 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, in den Organismus.

30 Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes β -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine β -Cyclase kodiert, verwendet werden.

35 Bei genomischen Hydroxylase- bzw. β -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw. β -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs, zu verwenden.

Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5, Protein: SEQ ID NO: 6).

- 5 Ein Beispiel für ein β -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 7, Protein: SEQ ID NO: 8).

- 10 In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder β -Cyclase-Gen vor.

- 15 In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der genetisch veränderte Organismus beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, auf.

- 20 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gen Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 70 %, noch bevorzugt mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 6, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

- 25 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Genen lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID. NO: 6 leicht auffinden.

- 30 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Genen lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 5 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 35 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 6.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 5, in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als β -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 8, und die die enzymatische Eigenschaft einer β -Cyclase aufweisen.

20

Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 8 leicht auffinden.

25

Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 7 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

30

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der β -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 8.

- 35 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 7 in den Organismus ein.

10

Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder β -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

15

Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Organismen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

20

Genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

25

genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen und

30

genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Die Herstellung dieser genetisch veränderten Organismen kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei oder drei der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

35

Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind, Carotinoide, insbesondere β -

Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

- 5 Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

10

Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

15

- 20 Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534, das Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodozyma*.

25

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

30

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

35

Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Bras-

sicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Astera-ceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

- 5 Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*,
10 *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*,
15 *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Lycopersicon*, *Rosa*, *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Petunia*, *Geranium*, *Tropaeolum* oder *Adonis*.

- 20 Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen ein Ernten der Organismen und weiter bevorzugt zusätzlich ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Organismen angeschlossen.

- 25 Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze oder Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren abgetrennt werden. Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

- 30 Die Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt bevorzugt in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C, wie z.B. 20°C bis 40 °C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9. Bei genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in
35 einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promotors. Die Kultivierung wird nach Induktion der Ketolaseexpression in Gegenwart von Sauerstoff, z.B. 12 Stunden bis 3 Tage, fortgesetzt.

Die Isolierung der Ketocarotinoide aus der geernteten Biomasse erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

Wie nachstehend erwähnt, können die Ketocarotinoide in den erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen vorzugsweise in verschiedenen Pflanzengeweben, wie beispielsweise Samen, Blätter, Früchte, Blüten, insbesondere in Blütenblättern spezifisch hergestellt werden.

Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Blütenblättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.

Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.

Je nach verwendetem Organismus fallen die Ketocarotinoide in freier Form oder als Fettsäureester an.

In Blütenblättern von Pflanzen fallen die Ketocarotinoide im erfindungsgemäßen Verfahren in Form ihrer Mono- oder Diester mit Fettsäuren an. Einige nachgewiesene Fettsäuren sind z.B. Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolensäure, und Laurinsäure (Kamata und Simpson (1987) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 86B(3), 587-591).

Die Herstellung der Ketocarotinoide kann in der ganzen Pflanze oder in einer bevorzugten Ausführungsform spezifisch in Pflanzengeweben, die Chromoplasten enthalten, erfolgen. Bevorzugt

te Pflanzengewebe sind beispielsweise Wurzeln, Samen, Blätter, Früchte, Blüten und insbesondere Nektarien und Blütenblätter, die auch Petalen bezeichnet werden.

5 In einer besonderes bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

10 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

15 In einer weiteren, besonderes bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Früchten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

20 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem fruchtspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

25 In einer weiteren, besonderes bevorzugten, Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Samen die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

30 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem samenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

35 Das Targeting in die Chromoplasten erfolgt durch ein funktionell verknüpftes plastidäres Transitpeptid.

Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der β -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Hydroxylase bzw. β -Cyclase anstelle von

Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

- 5 Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- 10 Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

- 15 Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

- Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-
- 20 Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente
- 25 derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

- Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie
- 30 die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

- Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten, aber nicht darauf beschränkten Sequenzen, sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in
- 35 Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärkern wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Als Promotor der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

- 5 "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

- 10 Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228), der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202), den Triose-Phosphat-Translokator (TPT) Promotor aus *Arabidopsis thaliana* Acc.-No. AB006698, Basenpaar 53242 bis 55281; das Gen beginnend ab 15 bp 55282 ist mit "phosphate/triose-phosphate translocator" annotiert, oder den 34S Promoter aus Figwort mosaic virus Acc.-No. X16673, Basenpaar 1 bis 554.

- 20 Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), der Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

30

- Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.
- 35

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814),
5 der licht-induzierbare PPK Promoter oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

10 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al.
15 (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

20 Umfasst sind auch verwundungsinduzierbare Promotoren wie der des pinII-Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

25 Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

30 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel, Samen und Wurzeln und Kombi-
35 nationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin-Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

5

Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen-Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593), der AP3 Promoter aus *Arabidopsis thaliana* (siehe Beispiel 5), der CHRC-Promoter (Chromoplast-specific carotenoid-associated protein (CHRC) gene promoter aus *Cucumis sativus* Acc.-No. AF099501, Basenpaar 1 bis 1532), der EPSP_Synthase Promotor (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. M37029, Basenpaar 1 bis 1788), der PDS Promotor (Phytoene desaturase gene promoter aus *Solanum lycopersicum*, Acc.-No. U46919, Basenpaar 1 bis 2078), der DFR-A Promotor (Dihydroflavonol 4-reductase gene A promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. X79723, Basenpaar 32 bis 1902) oder der FBP1 Promotor (Floral Binding Protein 1 gene promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. L10115, Basenpaar 52 bis 1069).

10

15

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), der glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

20

Samen-spezifische Promotoren sind beispielsweise der ACP05-Promotor (Acyl-carrier-Protein Gen, WO9218634), die Promotoren AtS1 und AtS3 von *Arabidopsis* (WO 9920775), der LeB4-Promotor von *Vicia faba* (WO 9729200 und US 06403371), der Napin-Promotor von *Brassica napus* (US 5608152; EP 255378; US 5420034), der SBP-Promotor von *Vicia faba* (DE 9903432) oder die Maispromotoren End1 und End2 (WO 0011177).

25

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

30

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, samenspezifische, fruchtspezifische, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

35

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen oder insbesondere einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987), beschrieben sind.

Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren, kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

30 pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGG-
35 TACTCCTTCTCCGCGCCGCGCGCGCGCTCGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGGGATCC_BamHI

pTP10

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTCTGCCT-
5 CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTACTGAGACTGCGCTGGATCC_BamHI

pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
10 TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTCTGCCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTACTGAGACTGCGGGGATCC_BamHI

15 Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopen-
tenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der
kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F,
Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign prote-
ins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

20

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen
sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthal-
ten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen beste-
hen.

25

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die
von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons
mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzen-
spezies exprimiert werden.

30

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipu-
liert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten
Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der
DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt wer-
den.
35

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrich-
tung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion
dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8,

vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-

- 5 Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

- 10 Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

- 15 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

- 20 Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

- 25 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

- 30 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

- 35 Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation tro-

ckener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN5 und pSUN3 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispiels-

weise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

5

Im folgenden wird die Herstellung der erfindungsgemäßen gentisch veränderten Mikroorganismen näher beschrieben:

10

Die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase oder β -Hydroxylase oder β -Cyclase sind vorzugsweise in Expressionskonstrukte eingebaut, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

15

Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer "operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

20

25

Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

30

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

35

Beispiele für brauchbare Promotoren in Mikroorganismen sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, lambda-PR- oder im lambda-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die

gram-positiven Promotoren amy und SPO2 oder die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P_TP_T-Promotor.

- 5 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

- 10 Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

- 15 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

- 20 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, β -Hydroxylase oder β -Cyclase sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

- 30 Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch
35 alle anderen dem Fachmann bekannte Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

5 Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

10 Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) und pET 11d (Studier et al. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89) oder pBluescript und pUC-Vektoren.

15 Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYepSec1 (Baldari et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

20 Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

25 Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

30 Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryontische und eukaryotische Zellen sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte bzw. Vektoren sind genetisch veränderte Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind.

35 Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Ex-

pression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

- 5 Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden.
- 10 Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.
- 15 Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen 8 oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem.
- 20 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen, dadurch gekennzeichnet, das man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen Promotor und Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, und gegebenenfalls einen Terminator in
- 25 das Genom des Ausgangsorganismus oder extrachromosomal in den Ausgangsorganismus einführt.
- 30 Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Organismen, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase
- A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und
- 35 B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz

durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 5 Wie vorstehend ausgeführt erfolgt die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp vorzugsweise durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

10

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend ausgeführt, die Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in die Pflanzen und damit vorzugsweise durch Überexpression oder transgene Expression von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

15

- 20 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus keine Ketolase oder eine endogen Ketolase aufweist und eine transgene Ketolase überexprimiert wird.

25

- 30 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus eine endogen Ketolase aufweist und die endogene Ketolase überexprimiert wird.

30

- 35 Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Organismen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität gegenüber einem Wildtyporganismus auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

35

Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind, Carotinoide, insbesondere β -Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534, das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodozyma*.

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornutum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Astera-
5 ceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae.

Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen
10 *Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola* oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Ma-
20 rigold, *Tagetes erecta, Tagetes patula, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium, Tropaeolum* oder *Adonis*.

Ganz besonders bevorzugte genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den Pflanzen-
25 gattungen *Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Adonis, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium* oder *Tropaeolum*, wobei die genetisch veränderte Pflanze mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthält.

30 Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Früchte, Samen, Blüten und Blütenblätter sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von
35 Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin verwendet werden.

Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Organismen, insbesondere Pflanzen oder Pflanzenteile, wie insbesondere Blütenblätter mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin können auch beispielsweise direkt oder nach

an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden.

5 Ferner können die genetisch veränderten Organismen zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten der Organismen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

10 Die genetisch veränderten Organismen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

15 Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

25 Die Erfindung betrifft ferner die neuen Ketolasen sowie die neuen Nukleinsäuren, die diese kodieren.

30 Insbesondere betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 2 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 2 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

35 Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz

SEQ. ID. NO. 4 aufweist. Die Sequenz SEQ ID NO: 4 ist, wie vorstehend erwähnt, in Datenbanken nicht annotiert.

5 Die Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, kodierend ein vorstehend beschriebenes Protein, mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure nicht die Sequenzen SEQ ID NO: 1 oder 3 enthält.

10 Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

15 Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

20 Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

30 Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

35

Im Vergleich zu den Verfahren des Standes der Technik, liefert das erfindungsgemäße Verfahren eine höhere Menge an Ketocarotinoide, insbesondere Astaxanthin.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiel 1:

- 5 Amplifikation von cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolasen aus *Nostoc punctiforme* PCC73102 ORF 38, contig 501 (SEQ ID NO: 1) und ORF 148, contig 502 (SEQ ID NO: 3) kodiert

- 10 Zellen von *Nostoc punctiforme* wurden mit Lysozym (2 mg/ml) aufgeschlossen und die genomische DNA mit Hilfe des GenElute Plant genomic DNA kit (Sigma) nach Angaben des Herstellers isoliert.

- 15 Dann erfolgte die Amplifikation von ORF148 (762 bp) aus der genomischen DNA von *Nostoc punctiforme* mit Hilfe der Primer 148-Start (SEQ ID NO: 9; 5' ATG ATC CAG TTA GAA CAA CCA C -3') und 148-End (SEQ ID NO: 10; 5' CTA TTT TGC TTT GTA AAT TTC TGG -3') bei einer Annealingtemperatur von 60°C über 30 Zyklen.

- 20 Zur Amplifizierung von ORF38 (789 bp) wurden die Primer 38-Start (SEQ ID NO: 11; 5' ATG AAT TTT TGT GAT AAA CCA GTT AG -3') und 38-End (SEQ ID NO: 12; 5' ACG AAT TGG TTA CTG AAT TGT TG -3') verwendet.

- 25 Die PCR Fragmente wurden in den mit *XcmI* geschnittenen Vektor pMON 38201 (Borokov, A.Y. and Rivkin, M.I. (1997) *XcmI* containing vector for direct cloning of pcr products. BioTech. 22, 812-814) subkloniert.

- 30 Zur Selektion positiver Klone wurde nach der Transformation der Ligationsprodukte in XI1 blue MRF1' ein blau-weiss screening durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit *HindIII* geschnitten, um zu überprüfen ob das PCR Amplifikat in den T-Überhangvektor kloniert wurde. Die Sequenzierung der ausgewählten Klone zeigte, dass die Orientierung von ORF148 in pMONT-148, bzw. ORF38 in pMONT-38, entgegen der vektoriellen Leserichtung ist. Das Herausschneiden des Inserts durch *HindIII* war möglich, da der T-Überhang Vektor neben der *HindIII* Schnittstelle im Polylinker noch eine zweite besitzt, die beim Einfügen des Polylinkers entstanden ist.

Beispiel 2

- 35 Herstellung von Expressionsvektoren zur Expression der *Nostoc punctiforme* PCC73102 Ketolasen ORF148 und ORF38 in Wirtsorganismen.

Nach Restriktionsverdau von pMONT148 bzw. pMONT38 mit *HindIII* wurden die erhaltenen DNA-Inserts in einen ebenfalls *HindIII* verdauten und dephosphorylierten pQE32 Vektor (Qia-

gen, Hilden; modifiziert wie in (Verdoes, J., Krubasik, P., Sandmann, G. & van Ooyen, M. (1999) Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Molec. Gen. Genet.* 262, 453-461) beschrieben kloniert.

- 5 Die nach Transformation in XL1MRF1' erhaltenen Klone wurden mit Hilfe einer check PCR unter Verwendung von Primer QEF (5' CCC TTT CCT CTT CTC -3') und 148-end bzw. 38-end überprüft. Die Sequenzierungen der entsprechenden Klone zeigte, dass ORF148 und ORF38 in frame in den pPQE32 Vektor kloniert wurden. Die so erhaltenen Plasmide sind in Abbildung 2B und 2C dargestellt. Abbildung 2 zeigt die Konstruktion von pPQE32-ORF 148 (B.) und pPQE32-
10 ORF 38 (C.) ausgehend von pPQE32 (A.).

Beispiel 3

Expression der *Nostoc punctiforme* PCC73102 Ketolasen ORF148 und ORF38 in β -Carotin und Zeaxanthin produzierenden *E. coli* Stämme und Analyse des Carotinoidprofils

15

3.1. Expression der *Nostoc punctiforme* PCC73102 Ketolasen ORF148 und ORF38 in β -Carotin produzierenden *E. coli* Stämme

20

Zur funktionellen Charakterisierung der durch ORF148 und ORF38 gebildeten Genprodukte wurden die Konstrukte pPQE32-148 und pPQE32-38 in die β -Carotin bildende *E. coli* Transformante JM101/pACCAR16 Δ crtX (Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiware, S., Saito, T. Ohtani, T. & Miki, W. (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* 22, 6575-6584) transformiert.

25

Die Anzucht der Transformanten erfolgte in 50 ml Kulturen mit LB Medium bei 28°C im Dunkeln für 16 bis 48 Stunden. Die Carotinoide wurden mit Methanol extrahiert, gegen 50% Ether/Petrolether ausgeschüttelt und die erhaltenen Extrakte über HPLC (Säule HypurityC18, Laufmittel: Acetonitril/Methanol/2-Propanol 85:10:5, Temperatur 32°C) aufgetrennt. Die Spektren
30 wurden mittels eines Dioden-Array Detektors on-line aufgezeichnet und die Carotinoide anhand ihrer Absorptionsmaxima sowie im Vergleich mit Standards identifiziert.

35

Wie in Abbildung 3A für pPQE32-38 und 3B für pPQE32-148 gezeigt, konnten neben dem Ausgangssubstrat β -Carotin in beiden Extrakten die Ketocarotinoide Echinenon und Canthaxanthin detektiert werden (in Kontrollen ohne pPQE32-38 bzw. pPQE32-148 war nur β -Carotin aber keine Ketocarotinoide zu finden).

Der Anteil des gebildeten Canthaxanthins (Diketo-Verbindung) am Gesamtcarotinoidgehalt betrug in der Komplementierung mit pPQE32-148 81%, in der Komplementierung mit pPQE32-38

lag er bei 40%. Der Anteil an Echinenon (Monoketo-Verbindung) lag in beiden Komplementierungen bei etwa 4%.

5 3.2. Expression der *Nostoc punctiforme* PCC73102 Ketolasen ORF148 und ORF38 in Zeaxanthin produzierenden *E. coli* Stämme

Um zu untersuchen in wie weit die durch ORF148 und ORF38 kodierten Ketolasen in der Lage sind das Ketocarotinoid Astaxanthin zu synthetisieren, wurden pPQE32-38 (Abb. 3C) und pPQE32-148 (Abb. 3D) in die Zeaxanthin bildende *E. coli* Transformande

10 JM101/pACCAR25 Δ crtX (Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiware, S., Saito, T. Ohtani, T. & Miki, W. (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol. 22, 6575-6584)transformiert.

15 Die Anzucht der Transformanden, die Carotinoidextraktion und die HPLC Trennung erfolgte wie oben unter 3.1 beschrieben. Während in dem aus der Komplementierung mit pPQE32-38 erhaltenen Extrakt nur die Ausgangssubstrate Zeaxanthin und β -Carotin, 85 bzw. 5% des Gesamtcarotinoidgehalts, nachgewiesen werden konnten, konnten in der Komplementierung mit pPQE32-148 hauptsächlich die Ketocarotinoide Echinenon, Canthaxanthin und Astaxanthin detektiert
20 werden. Der Anteil von Astaxanthin am Gesamtcarotinoidgehalt beträgt 50%. Die Intermediate der Astaxanthinsynthese Echinenon und Canthaxanthin stellen 12% bzw. 8% des Gesamtcarotinoids dar. Der Anteil an β -Carotin beträgt etwa 30%.

25 Abbildung 3 zeigt die HPLC Trennung der Carotinoide aus Komplementierung in *E. coli* mit einem β -Carotin Hintergrund kotransformiert mit pPQE32-38 (A) oder pPQE32-148 (B) bzw. in *E. coli* mit einem Zeaxanthin Hintergrund kotransformiert mit pPQE32-38 (C) oder pPQE32-148 (D).

30 Die angegebenen Carotinoide wurden durch Kochromatographie mit Vergleichssubstanzen und über ihre Spektren identifiziert als:

- 1 Canthaxanthin,
- 2 Echinenon, .
- 3 β -Carotin,
- 4 Zeaxanthin,
- 35 5 Astaxanthin,
- 6 β -Cryptoxanthin,
- 7 Neurosporin.

1', 3', 4' und 5' bezeichnen die entsprechenden cis Isomere.

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

10

SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft
 5 <120> Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung
 von genetisch veränderten Organismen
 <130> AE 20020904
 10 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.1
 15 <210> 1
 <211> 789
 20 <212> DNA
 <213> Nostoc sp. PCC73102
 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(789)
 30 <223>
 <400> 1
 35 ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48
 Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
 1 5 10 15
 40 tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
 20 25 30
 45 att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat 144
 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
 35 40 45
 50 tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa 192
 Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
 50 55 60
 55 atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat 240
 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
 65 70 75 80
 60 ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca 288
 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
 85 90 95
 65 cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag 336
 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
 100 105 110
 aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat 384
 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
 115 120 125
 70 ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc 432
 Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe

	130	135	140	
5	atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160			480
10	ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175			528
15	tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190			576
20	ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr 195 200 205			624
25	ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile 210 215 220			672
30	gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240			720
35	gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn 245 250 255			768
40	aat tca gta acc aat tcg taa Asn Ser Val Thr Asn Ser 260			789
45	<210> 2			
50	<211> 262			
55	<212> PRT			
60	<213> Nostoc sp. PCC73102			
65	<400> 2			
70	Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln 1 5 10 15			
75	Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val 20 25 30			
80	Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn 35 40 45			
85	Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60			
90	Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80			

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
85 90 95

5 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
100 105 110

10 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
115 120 125

15 Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe
130 135 140

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu
145 150 155 160

20 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile
165 170 175

25 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

30 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr
195 200 205

35 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile
210 215 220

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

40 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
245 250 255

45 Asn Ser Val Thr Asn Ser
260

50 <210> 3
<211> 762
<212> DNA

55 <213> Nostoc sp. PCC73102

60 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (762)

65 <223>

	<400> 3																
5	gtg	atc	cag	tta	gaa	caa	cca	ctc	agt	cat	caa	gca	aaa	ctg	act	cca	48
	Val	Ile	Gln	Leu	Glu	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Gln	Ala	Lys	Leu	Thr	Pro	
	1				5					10					15		
10	gta	ctg	aga	agt	aaa	tct	cag	ttt	aag	ggg	ctt	ttc	att	gct	att	gtc	96
	Val	Leu	Arg	Ser	Lys	Ser	Gln	Phe	Lys	Gly	Leu	Phe	Ile	Ala	Ile	Val	
				20					25					30			
15	att	gtt	agc	gca	tgg	gtc	att	agc	ctg	agt	tta	tta	ctt	tcc	ctt	gac	144
	Ile	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp	
			35					40					45				
20	atc	tca	aag	cta	aaa	ttt	tgg	atg	tta	ttg	cct	gtt	ata	cta	tgg	caa	192
	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Phe	Trp	Met	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Trp	Gln	
		50					55					60					
25	aca	ttt	tta	tat	acg	gga	tta	ttt	att	aca	tct	cat	gat	gcc	atg	cat	240
	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ser	His	Asp	Ala	Met	His	
	65					70				75						80	
30	ggc	gta	gta	ttt	ccc	caa	aac	acc	aag	att	aat	cat	ttg	att	gga	aca	288
	Gly	Val	Val	Phe	Pro	Gln	Asn	Thr	Lys	Ile	Asn	His	Leu	Ile	Gly	Thr	
					85					90					95		
35	ttg	acc	cta	tcc	ctt	tat	ggt	ctt	tta	cca	tat	caa	aaa	cta	ttg	aaa	336
	Leu	Thr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys	
				100					105					110			
40	aaa	cat	tgg	tta	cac	cac	cac	aat	cca	gca	agc	tca	ata	gac	ccg	gat	384
	Lys	His	Trp	Leu	His	His	His	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Ile	Asp	Pro	Asp	
			115					120					125				
45	ttt	cac	aat	ggt	aaa	cac	caa	agt	ttc	ttt	gct	tgg	tat	ttt	cat	ttt	432
	Phe	His	Asn	Gly	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Phe	Ala	Trp	Tyr	Phe	His	Phe	
			130				135					140					
50	atg	aaa	ggt	tac	tgg	agt	tgg	ggg	caa	ata	att	gcg	ttg	act	att	att	480
	Met	Lys	Gly	Tyr	Trp	Ser	Trp	Gly	Gln	Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Ile	Ile	
	145					150					155					160	
55	tat	aac	ttt	gct	aaa	tac	ata	ctc	cat	atc	cca	agt	gat	aat	cta	act	528
	Tyr	Asn	Phe	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu	His	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Thr	
					165					170					175		
60	tac	ttt	tgg	gtg	cta	ccc	tcg	ctt	tta	agt	tca	tta	caa	tta	ttc	tat	576
	Tyr	Phe	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	
				180					185					190			
65	ttt	ggt	act	ttt	tta	ccc	cat	agt	gaa	cca	ata	ggg	ggt	tat	ggt	cag	624
	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Ile	Gly	Gly	Tyr	Val	Gln	
			195					200					205				
70	cct	cat	tgt	gcc	caa	aca	att	agc	cgt	cct	att	tgg	tgg	tca	ttt	atc	672
	Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Phe	Ile	
			210				215					220					
75	acg	tgc	tat	cat	ttt	ggc	tac	cac	gag	gaa	cat	cac	gaa	tat	cct	cat	720
	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	
						230					235					240	
80	att	tct	tgg	tgg	cag	tta	cca	gaa	att	tac	aaa	gca	aaa	tag			762
	Ile	Ser	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	Ala	Lys				
					245					250							

<210> 4
<211> 253
5 <212> PRT
<213> Nostoc sp. PCC73102
10
<400> 4
15 Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro
1 5 10 15
Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val
20 20 25 30
Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp
35 40 45
25 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln
50 55 60
30 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His
65 70 75 80
35 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr
85 90 95
Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys
40 100 105 110
Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp
115 120 125
45 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
130 135 140
50 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
145 150 155 160
55 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
165 170 175
Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
60 180 185 190
Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
195 200 205
65 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
210 215 220

5 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
 225 230 235 240
 Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys
 245 250
 10 <210> 5
 <211> 1608
 15 <212> DNA
 <213> Haematococcus pluvialis
 20 <220>
 <221> CDS
 25 <222> (3)..(971)
 <223>
 30 <400> 5
 ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc 47
 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile
 1 5 10 15
 35 ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg 95
 Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu
 20 25 30
 40 tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc cgc gtt gaa cta gcc 143
 Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala
 35 40 45
 45 cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg 191
 Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser
 50 55 60
 50 tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcg ctg gga 239
 Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly
 65 70 75
 55 acc gtg cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca 287
 Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala
 80 85 90 95
 60 ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa 335
 Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys
 100 105 110
 65 cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc 383
 Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly
 115 120 125
 65 gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac 431
 Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His
 130 135 140

	atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc	479
	Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu	
	145 150 155	
5	ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat	527
	Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr	
	160 165 170 175	
10	gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tgc cct ctg ggc tgg ctg ctg cac	575
	Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His	
	180 185 190	
15	aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg	623
	Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu	
	195 200 205	
20	ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc	671
	Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly	
	210 215 220	
25	ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg	719
	Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu	
	225 230 235	
30	ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg	767
	Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu	
	240 245 250 255	
35	gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg	815
	Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met	
	260 265 270	
40	aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt	863
	Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly	
	275 280 285	
45	ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att	911
	Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile	
	290 295 300	
50	cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg	959
	Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp	
	305 310 315	
55	tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct ggtttcacac ctcatgcctg	1011
	Ser Lys Arg	
	320	
60	tgataagggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacgggtcg actggtctga	1071
	tggccaatgg catcggccat gtctgggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaagggtgatg	1131
	cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc	1191
65	caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcgggt tgtgaagcaa tgactccgcc	1251
	catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta	1311
	gtgcagcaaaa ctatattcac ctagggtgtg ttgtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg	1371
	catgatgtac tcgtcatgggt gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc	1431
	agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga	1491
70	ggctcggtcc agaaatgggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcagggtgaga	1551
	tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	1608

<210> 6

5 <211> 322

<212> PRT

10 <213> Haematococcus pluvialis

<400> 6

15 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly
1 5 10 1520 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser
20 25 3025 Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg
35 40 45Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu
50 55 6030 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr
65 70 75 8035 Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu
85 90 9540 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg
100 105 11045 Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val
115 120 125Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met
130 135 14050 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu
145 150 155 16055 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala
165 170 17560 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys
180 185 19065 Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe
195 200 205

Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe

210

215

220

5 Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly
225 230 235 240

10 Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val
245 250 255

His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys
260 265 270

15 Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly
275 280 285

20 Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro
290 295 300

25 Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser
305 310 315 320

Lys Arg

30

<210> 7

<211> 1650

35

<212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum

40

<220>

<221> CDS

45

<222> (112)..(1614)

<223>

50

<400> 7
ggcaccgagga aactttttctc tcttcactag ctgtttacat gcttgaaatt tcaagatttt 60

55 aggaccccat ttgaagtttt cttgaaacaa atattaccct gttggaaaaa g atg gat 117
Met Asp
1

60 act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca cat cat 165
Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro His His
5 10 15

65 ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat cat aat 213
Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His His Asn
20 25 30

ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt tgt gtt 261

	Phe	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe	Cys	Glu	Thr	Leu	Gly	Arg	Ser	Val	Cys	Val	
	35					40					45				50		
5	aag	ggt	agt	agt	agt	gct	ctt	tta	gag	ctt	gta	cct	gag	acc	aaa	aag	309
	Lys	Gly	Ser	Ser	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Leu	Val	Pro	Glu	Thr	Lys	Lys	
					55					60					65		
10	gag	aat	ctt	gat	ttt	gag	ctt	cct	atg	tat	gac	cct	tca	aaa	ggg	ggt	357
	Glu	Asn	Leu	Asp	Phe	Glu	Leu	Pro	Met	Tyr	Asp	Pro	Ser	Lys	Gly	Val	
				70					75					80			
15	ggt	gtg	gat	ctt	gct	gtg	ggt	ggg	ggc	cct	gca	gga	ctt	gct	ggt		405
	Val	Val	Asp	Leu	Ala	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Val	
			85					90				95					
20	gca	cag	caa	ggt	tct	gaa	gca	gga	ctc	tct	ggt	tgt	tca	att	gat	ccg	453
	Ala	Gln	Gln	Val	Ser	Glu	Ala	Gly	Leu	Ser	Val	Cys	Ser	Ile	Asp	Pro	
		100					105					110					
25	aat	cct	aaa	ttg	ata	tgg	cct	aat	aac	tat	ggt	ggt	tgg	gtg	gat	gaa	501
	Asn	Pro	Lys	Leu	Ile	Trp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Val	Asp	Glu	
		115				120					125					130	
30	ttt	gag	gct	atg	gac	ttg	tta	gat	tgt	cta	gat	gct	acc	tgg	tct	ggt	549
	Phe	Glu	Ala	Met	Asp	Leu	Leu	Asp	Cys	Leu	Asp	Ala	Thr	Trp	Ser	Gly	
					135					140					145		
35	gca	gca	gtg	tac	att	gat	gat	aat	acg	gct	aaa	gat	ctt	cat	aga	cct	597
	Ala	Ala	Val	Tyr	Ile	Asp	Asp	Asn	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	His	Arg	Pro	
				150					155					160			
40	tat	gga	agg	ggt	aac	cgg	aaa	cag	ctg	aaa	tcg	aaa	atg	atg	cag	aaa	645
	Tyr	Gly	Arg	Val	Asn	Arg	Lys	Gln	Leu	Lys	Ser	Lys	Met	Met	Gln	Lys	
			165					170					175				
45	tgt	ata	atg	aat	ggt	ggt	aaa	ttc	cac	caa	gcc	aaa	ggt	ata	aag	gtg	693
	Cys	Ile	Met	Asn	Gly	Val	Lys	Phe	His	Gln	Ala	Lys	Val	Ile	Lys	Val	
		180					185					190					
50	att	cat	gag	gaa	tcg	aaa	tcc	atg	ttg	ata	tgc	aat	gat	ggt	att	act	741
	Ile	His	Glu	Glu	Ser	Lys	Ser	Met	Leu	Ile	Cys	Asn	Asp	Gly	Ile	Thr	
		195				200					205					210	
55	att	cag	gca	acg	gtg	gtg	ctc	gat	gca	act	ggc	ttc	tct	aga	tct	ctt	789
	Ile	Gln	Ala	Thr	Val	Val	Leu	Asp	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Arg	Ser	Leu	
					215					220					225		
60	ggt	cag	tat	gat	aag	cct	tat	aac	ccc	ggg	tat	caa	ggt	gct	tat	ggc	837
	Val	Gln	Tyr	Asp	Lys	Pro	Tyr	Asn	Pro	Gly	Tyr	Gln	Val	Ala	Tyr	Gly	
				230					235					240			
65	att	ttg	gct	gaa	gtg	gaa	gag	cac	ccc	ttt	gat	gta	aac	aag	atg	ggt	885
	Ile	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	His	Pro	Phe	Asp	Val	Asn	Lys	Met	Val	
			245					250					255				
70	ttc	atg	gat	tgg	cga	gat	tct	cat	ttg	aag	aac	aat	act	gat	ctc	aag	933
	Phe	Met	Asp	Trp	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Lys	Asn	Asn	Thr	Asp	Leu	Lys	
		260					265					270					
75	gag	aga	aat	agt	aga	ata	cca	act	ttt	ctt	tat	gca	atg	cca	ttt	tca	981
	Glu	Arg	Asn	Ser	Arg	Ile	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ala	Met	Pro	Phe	Ser	
		275				280					285					290	
80	tcc	aac	agg	ata	ttt	ctt	gaa	gaa	aca	tca	ctc	gta	gct	cgt	cct	ggc	1029
	Ser	Asn	Arg	Ile	Phe	Leu	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Ala	Arg	Pro	Gly	
					295					300					305		

	ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta aac cat	1077
	Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu Asn His	
	310 315 320	
5	ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt cta ata	1125
	Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys Leu Ile	
	325 330 335	
10	cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt gga atc	1173
	Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val Gly Ile	
	340 345 350	
15	ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg gtg gca	1221
	Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala	
	355 360 365 370	
	agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att caa tac	1269
	Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile Gln Tyr	
	375 380 385	
20	ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca gct gtt	1317
	Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr Ala Val	
	390 395 400	
25	tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag ttc ttc	1365
	Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu Phe Phe	
	405 410 415	
30	tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct aca aga	1413
	Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala Thr Arg	
	420 425 430	
35	agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg cat ggc	1461
	Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp His Gly	
	435 440 445 450	
40	ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt ggg ctg	1509
	Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe Gly Leu	
	455 460 465	
45	tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata atg aca	1557
	Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile Met Thr	
	470 475 480	
50	aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta cag gat	1605
	Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu Gln Asp	
	485 490 495	
55	aaa gaa tga atccgagtaa ttcggaatct tgtccaatct cgtgcc	1650
	Lys Glu	
	500	
60	<210> 8	
	<211> 500	
	<212> PRT	
	<213> Lycopersicon esculentum	
65	<400> 8	
	Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro	
	1 5 10 15	

His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
20 25 30
5
His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
35 40 45
10
Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
50 55 60
15
Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
65 70 75 80
20
Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
85 90 95
25
Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile
100 105 110
30
Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val
115 120 125
35
Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp
130 135 140
40
Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His
145 150 155 160
45
Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met
165 170 175
50
Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile
180 185 190
55
Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly
195 200 205
60
Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg
210 215 220
65
Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala
225 230 235 240
Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys
245 250 255
Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp
260 265 270
Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro

275 280 285

5 Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg
290 295 300

10 Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu
305 310 315 320

Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys
325 330 335

15 Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val
340 345 350

20 Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met
355 360 365

25 Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile
370 375 380

30 Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr
385 390 395 400

Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu
405 410 415

35 Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala
420 425 430

40 Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp
435 440 445

45 His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe
450 455 460

50 Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile
465 470 475 480

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu
485 490 495

55 Gln Asp Lys Glu
500

60 <210> 9
<211> 22
<212> DNA

65 <213> künstliche Sequenz

<220>
5 <221> Primer
<222> (1)..(22)
<223> 148-Start
10

15 <400> 9 22
atgatccagt tagaacaacc ac

20 <210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz
25

30 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(24)
<223> 148-End
35

40 <400> 10 24
ctattttgct ttgtaaattt ctgg

45 <210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz
50

55 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
<223> 38-Start

60 <400> 11 26
atgaattttt gtgataaacc agttag

65 <210> 12

<211> 23

<212> DNA

5 <213> künstliche Sequenz

<220>

10 <221> Primer

<222> (1)..(23)

15 <223> 38-End

20 <400> 12
acgaattggg tactgaattg ttg

23

Abbildung 1

Nucleotidsequenz ORF 38 (786 bp)

5 TTGAATTTTTGTGATAAACCAAGTTAGCTATTATGTTGCAATAGAGCAATTAAGTGCTAAA-
GAAGATACTGTTTGGGGGCTGGTGATTGTCATAGTAATTATTAGTCTTTGGGTAGC-
TAGTTTGGCTTTTTTACTAGCTATTAATTATGCCAAAGTCCCAATTTGGTTGATACCTATTG-
CAATAGTTTGGCAAATGTTCTTTTATACAGGGCTATTTATTACTGCACATGATGCTATG-
CATGGGTCAGTTTATCGTAAAAATCCCAAATTAATAATTTTATCGGTTCACTAGCTG-
TAGCGCTTTACGCTGTGTTTCCATATCAACAGATGTTAAAGAATCATTGCTTACAT-
10 CATCGTCATCCTGCTAGCGAAGTTGACCCAGATTTTCATGATGGTAAGAGAACAAACGC-
TATTTTCTGGTATCTCCATTTTCATGATAGAATACTCCAGTTGGCAACAGTTAATAGTAC-
TAACTATCCTATTTAATTTAGCTAAATACGTTTTGCACATCCATCAAATAAATCTCATCT-
TATTTTGGAGTATTCCTCCAATTTTAAGTTCCATTCAACTGTTTTATTTTCGGAA-
CATTTTGCCTCATCGAGAACCCAAGAAAGGATATGTTTATCCCCATTGCAGCCAAACAA-
15 TAAAATTGCCAACTTTTTTGTCAATTTATCGCTTGCTACCACTTTGGTTATCATGAAGAACAT-
CATGAGTATCCCATGTACCTTGGTGGCAACTTCCATCTGTATATAAGCAGAGAGTATT-
CAACAATTCAGTAACCAATTCGTAA

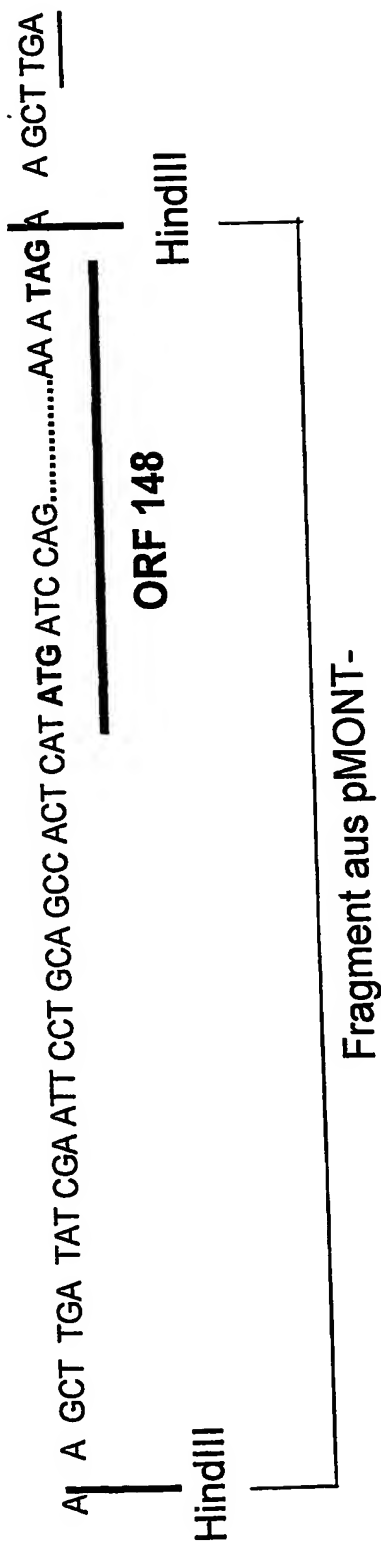
20 Nukleotidsequenz ORF 148 (759 bp)

GTGATCCAGTTAGAACCAACCACTCAGTCATCAAGCAAACTGACTCCAGTACTGAGAAGTA
AATCTCAGTTTAAGGGGCTTTTCATTGCTATTGTCATTGTTAGCGCATGGGTCATTAGCCTG
AGTTTATTACTTTCCCTTGACATCTCAAAGCTAAAATTTTGGATGTTATTGCCTGTTATACTA
TGGCAAACATTTTTATATACGGGATTATTTATTACATCTCATGATGCCATGCATGGCGTAG-
25 TATTTCCCCAAAACACCAAGATTAATCATTTGATTGGAACATTGACCCTATCCCTT-
TATGGTCTTTTACCATATCAAAAACCTATTGAAAAACATTGGTTACACCACCACAATCCAG-
CAAGCTCAATAGACCCGGATTTTCACAATGGTAAACACCAAAGTTTCTTTGCTTGG-
TATTTTCATTTTATGAAAGGTTACTGGAGTTGGGGGCAAATAATTGCGTTGACTATTATT-
TATAACTTTGCTAAATACATACTCCATATCCCAAGTGATAATCTAACTTACTTTTGGGTGC-
30 TACCCTCGCTTTTAAGTTCATTACAATTATTCTATTTTGGTACTTTTTTACCCCATAGT-
GAACCAATAGGGGGTTATGTTGAGCCTCATTGTGCCCAAACAATTAGCCGTCC-
TATTTGGTGGTCATTTATCACGTGCTATCATTTTGGCTACCACGAGGAACATCACGAA-
TATCCTCATATTTCTTGGTGGCAGTTACCAGAAATTTACAAAGCAAAATAG

A

pPQE3 — CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGG A TC CGC A TG CGA G CT CGG TAC CCC GGG TCG ACC TGC

B



C

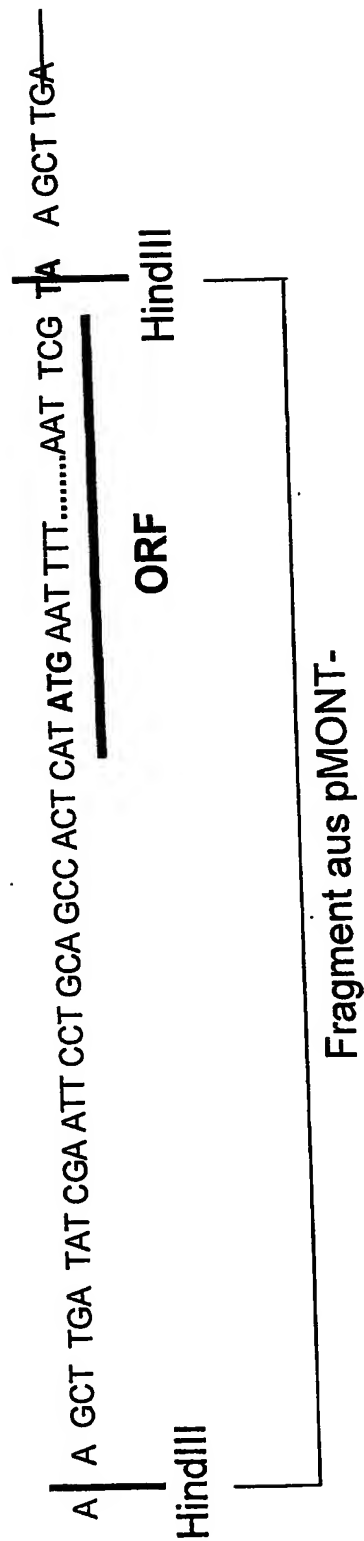


Abbildung 3

